

## 세균 분리주 KTB61의 담배 모자이크 바이러스(TMV) 감염 억제 효과

김영숙<sup>1</sup> · 여운형\*<sup>2</sup> · 유승현<sup>1</sup> · 김갑식<sup>2</sup>

<sup>1</sup>충남대학교 농과대학 농생물학과, <sup>2</sup>KT&G 중앙연구원  
(2002년 6월 10일 접수)

## Inhibitory Activity of Bacterial Isolate *Pseudomonas* sp. KTB61 against Tobacco Mosaic Virus(TMV) Infection to Tobacco Plants

Young Sook Kim<sup>1</sup>, Woon-Hyung Yeo\*<sup>2</sup>, Seung-Hun Yu<sup>1</sup>, Kab-Sig Kim<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Chungnam National University, Taejon, Korea 305-764. <sup>2</sup>KT&G Central Research Institute.

(Received June 10, 2002)

**ABSTRACT** : During the screening of antiviral substances having inhibitory effect on tobacco mosaic virus(TMV) infection to tobacco plants, we found that a bacterial isolate, KTB61, which was identified as a *Pseudomonas* sp., strongly inhibited the formation of TMV local lesions. When the culture filtrate from KTB61 was applied on the upper surface of leaves of *N. tabacum* Xanthi-nc tobacco at the same time of or 24 hours before TMV inoculation, almost complete inhibition was achieved. Incidence of systemic TMV infection to the susceptible tobacco cultivar, NC82, was reduced by 95% when TMV was inoculated onto the upper surface of leaves 24 hours after spraying the culture filtrate. Also 75~80% of inhibitory effect was obtained by the inoculation of TMV onto the under surface of the leaves treated with culture filtrate 24 hours beforehand. In field trials, the TMV infection was reduced by 96.5% when the tobacco seedlings, *N. tabacum* cv. NC82, were soaked with culture filtrate before transplanting.

**Key words** : TMV Infection Inhibitor, *Pseudomonas* sp.

식물 바이러스병의 방제수단으로 식물 재배시기의 조절, 무병 식물체 재배 등의 경종적 방법(Quiot, J. B. 등. 1982), 바이러스 매개체인 곤충을 방제하는 방법(Harpaz, I. 1982), 유전공학 기법을 이용한 바이러스 내성 식물체 개발(Lawson, C. 1990과 Quemada, H. D. 1991) 등의 방제법이 연구되고 있으나 근본적으로 효율적인 방제법은 정착되어 있지 않다. 특히 감염된 식물체에 직접 처리하여 바이러스를 방제할 수 있는 화학요법제의 개발

은 전무한 실정이다. 항바이러스 약제 개발을 위한 연구로는 2-thiouracil이 담배 잎에서 TMV의 증식을 억제한다는 보고(Commoner, B. 등 1952)를 효시로 Hare & Lucas 등의 우유 처리에 의한 TMV 접촉전염 억제효과(Harw, W. W. 등 1959), Watanabe 등의 계면 활성제 dodecyl-benzene sulfonate 처리에 의한 TMV 감염저지효과(Watanabe, T. Y. 등 1980), Tomas & John 등의 Carbendazim의 벼 tungro virus 병징발현억제

\*연락처 : 305-345 대전광역시 유성구 신성동 302 번지, KT&G 중앙연구원

\*Corresponding author : KT&G Central Research Institute, 302 Shinseong-Dong, Yusong-Gu, Daejeon 305-345, Korea

(Tomas, J. 등 1980)등이 보고되었다. 또한 고등식물 즙액의 TMV 감염억제 효과는 1925년 이후, 명아주과와 자리공과 식물을 포함한 여러 식물에서 보고(최, 1983)되어 있으며, 항바이러스 성분으로 단백질, 당단백질, phenol화합물 등이 알려져 있다(최 와 정, 1984).

식물바이러스병의 경우 국내외의 많은 연구사례에도 불구하고 아직까지 치료가 어려운데 가장 큰 이유는 감염을 예방하거나 감염된 식물체에 직접 처리하여 바이러스를 방제할 수 있는 약제개발이 미흡한데 있다. 결국 식물바이러스병의 효과적인 방제를 위해서는 기존의 방제기술과 병행하여 사용할 수 있는 무공해 약제개발이 중요한 과제라 할 수 있으며 바이러스에 선택적으로 작용하는 생물제어인자를 찾기 위해서는 자연 중에 풍부하고 다양하게 존재하는 미생물과 식물로부터 얻어지는 각종 생리활성물질을 탐색하여 이들의 항 식물바이러스 활성을 검정하는 것이 매우 중요한 수단이 될 수 있다. 본 연구는 각종 미생물로부터 TMV의 감염 저지효과를 갖는 균주를 탐색하고, 이들 중 침투이행효과와 전신이행효과를 갖는 균주를 선발하여 식물바이러스병 방제제 개발가능성을 검토하기 위하여 실시하였다.

## 재료 및 방법

**균 동정 및 배양 :** 담배 근권에서 분리한 KTB61 균은 fatty acid, isoprenoid quinone, 16S rRNA sequence 분석에 의해 동정하였다. 분리균은 Mueller Hinton broth(30°C, 60rpm, 4days)에서 배양한 후 원심분리(10,000g×40min)하여 상정액과 균체를 TMV 감염 억제 활성 조사에 사용하였다.

**Virus와 기주 식물 :** 바이러스 감염억제 활성 조사용 바이러스로는 TMV(common strain)를 사용하였다. 즉 TMV에 이병된 NC82 담배 건엽을 1000배 희석하여 사용하였으며, 기주식물로 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc와 NC82를 사용하였다.

**활성검정 :** 국부병반 기주(Xanthi-nc)를 이용한 항 바이러스 활성조사는 반엽법에 의해 조사하였다. 항 바이러스 효과는 바이러스 접종 2~3일 후 나타난 처리 반엽과 무처리 반엽의 국부 병반수를

다음 식에 따라 조사하였다.

$$\text{Inhibitory effects (\%)} = \{1 - (T/C)\} \times 100$$

T: 처리구 병반수, C: 무처리구 병반수

전신병반 기주에서의 TMV 감염억제 효과는 온실 조건에서 5주간 생육시킨 4~5엽기의 NC82 육묘를 사용하였다. 바이러스 접종은 표면 접종과 이면 접종으로 구분하였으며, 표면 접종은 최대엽 2 앞에 면봉 접종하였으며, 이면 접종은 바이러스액이 묻은 손으로 잎 이면을 문질러 접종하였다.

## 결 과

**분류학적 특성 :** KTB61 균은 Gram 음성세균으로 0.5~1.0(1.5~3.0)μm의 간상균으로 노란색의 색소를 생산하고 운동성을 보였다. 균체지방산 분석 결과 C<sub>18:1</sub>(44.32%), C<sub>16:0</sub>(20.73%), Summed feature3가 주요 성분으로 존재하고, 3-OH C<sub>10:0</sub>, 3-OH C<sub>12:0</sub>가 검출되었다. Isoprenoid quinone의 분석 결과 ubiquinone을 함유하고 있었으며 Q-9가 주요 ubiquinone으로 존재하였다. 기타 16S rRNA의 염기서열 분석결과와 상기의 결과를 종합하여 볼 때 KTB61 균주는 *Pseudomonas* 속의 세균으로 동정되었다.

**TMV 감염저해활성 :** 배양액과 TMV를 1:1로 혼합한 후 담배(*N. tabacum* cv. Xanthi-nc) 잎에 처리 시 100%의 강한 감염 억제 활성을 보였다(Table 1). 한편 현재 농가에서 TMV 방제수단으로 사용 중인 skim milk의 감염 억제 활성도 100%였으나 일본에서 식물 바이러스병 방제제로 개발된 sodium alginate는 26.8%의 감염 억제 효과를 보였다. Xanthi-nc의 잎 표면과 이면에 배양액을 처리하고 24시간 후 잎 표면에 TMV를 접종하여 전처리 시 감염 억제 효과를 알아 본 결과 표면 전처리 시에도 혼합처리와 같은 100%의 감염 억제 효과를 보였으며 이면 처리 시에도 72.5%의 높은 감염 억제 효과를 보였다(Table 2). 한편, 표면 전처리 시 활성 물질을 처리하지 않은 대조 반엽의 병반수도 현저하게 감소하여 항바이러스 물질이 잎 표면에서 이행함을 알 수 있었다.

세균 분리주 KTB61의 담배 모자이크 바이러스(TMV) 감염 억제 효과

Table 1. Inhibitory effects of culture filtrate from KTB61 isolate on the infection of TMV to tobacco plant(Xanthi-nc)

Sample <sup>a</sup>	Number of local lesions on half leaf <sup>c</sup>		Inhibition (%)
	Treated	Untreated	
Culture filtrate	0	102	100
Skim milk (10%)	0	171	100
Na-alginate (1%)	101	138	26.8
MH broth <sup>b</sup>	150	146	0.2

<sup>a</sup>Sample was applied onto half leaf of Xanthi-nc plants as a mixture of TMV sap

<sup>b</sup>Mueller hinton broth

<sup>c</sup>Mean number of local lesions on 3 half leaves of Xanthi-nc tobacco.

KTB61 균주가 생산하는 TMV 감염저해물질의 전신이행 작용에 의한 감염 억제 효과(systemic effect)를 알아보기 위해 하위 엽에 배양여액을 처리하고 72시간이 경과한 후 그 상부 잎에 TMV를 접종하여 감염 정도를 조사하였다. 그 결과 배양여액을 처리한 5위엽(100% 감염억제효과)뿐만 아니라 그 상위에 존재하는 잎에서도 78.4~87.5%의 높은 TMV 감염 억제 활성을 보여 전신이행효과가

Table 3. Systemic inhibitory effect of culture filtrate from KTB61 on the infection of TMV to tobacco plants(Xanthi-nc)

Leaf position <sup>a</sup>	Number of local lesions/leaf <sup>b</sup>		Inhibition (%)
	Treated	Untreated <sup>c</sup>	
5	0	65	100
6	8	56	85.7
7	21	97	78.4
8	69	75	8.5

<sup>a</sup>Culture filtrate was sprayed onto whole surface of 5 basal leaves (1st to 5th above soil level) of Xanthi-nc tobacco and 3 days after treatment, TMV was inoculated on 3 upper-untreated leaves (6th to 8th) and on a treated leaf (5th).

<sup>b</sup>Mean no. of local lesions on 3 leaves of Xanthi-nc

<sup>c</sup>Distilled water was applied to instead of culture filtrate

확인되었다(Table. 3).

농가 재배종인 황색종 담배 NC82에서의 TMV 감염 예방 효과를 조사하기 위해 KTB61 균주 배양여액을 담배유묘 표면에 살포하고 24시간 후 TMV를 접종한 후 발병 정도와 병징의 진전 속도

Table 2. Inhibitory effect of culture filtrate from KTB61 on the infection of TMV to tobacco plant(Xanthi-nc)

Sample <sup>a</sup>	Leaf surface treated	No. of local lesion/half leaf <sup>b</sup>		Inhibition (%)
		Untreated	Treated	
Culture filtrate	Upper surface	28.3	0	100
	Under surface	186	51	72.5
Skim milk (10%)	Upper surface	245	50	79.5
	Under surface	221	215	2.7
Na-alginate (1%)	Upper surface	203	172	15.2
	Under surface	190	185	2.8
MH broth	Upper surface	238	211	11.3
	Under surface	194	181	6.7

<sup>a</sup>Sample was applied 24h before TMV inoculation.

<sup>b</sup>Mean number of local lesions on 3 half leaves of Xanthi-nc tobacco.

Table 4. Inhibitory effects of culture filtrate from KTB61 isolate against TMV infection on tobacco plants(NC82)

Inoculation surface	Time after Inoculation (weeks)	No. of infected / tested plants			
		KTB61 <sup>a</sup>	Na-alginate <sup>b</sup>	Skim milk <sup>c</sup>	Control <sup>d</sup>
Upper surface	2	1/20	18/20	2/20	20/20
	3	1/20	19/20	2/20	20/20
Under surface	2	5/20	20/20	20/20	19/20
	3	4/20	20/20	20/20	20/20

<sup>a</sup>Culture filtrate of KTB61, <sup>b</sup>1% aqueous solution, <sup>c</sup>10% aqueous solution, <sup>d</sup>MH broth

를 조사하였다. 그 결과 배양여액을 처리한 동일 표면에 TMV 접종시 접종 3주 후 까지 95%의 높은 감염 억제 효과를 보였으며, 표면에 배양여액을 처리하고 이면에 바이러스를 접종해도 75~80%의 병발생 억제 효과를 보였다(Table 4).

KTB61 균주 배양여액의 포장조건에서 TMV 감염 예방 효과는 Table 5와 같다. 이식작업 1일전 배양여액을 1회 살포하고 TMV에 오염된 손으로 담배 이면으로부터 감염을 유도한 결과, 접종 4주 후까지 43.0%의 감염 예방 효과를 보였으며 이식작업 당일 배양 여액에 담배 유묘를 침지처리 한 경우에는 96.5%의 아주 높은 예방효과를 보였다.

한편 농가에서 TMV 방제 수단으로 사용 중인

skim milk 수용액은 표면 살포시 6.7%, 침지처리 시 79.3%의 방제 효과를 나타내어 침지처리가 효과적인 처리 방법임을 알 수 있었다.

## 고 찰

국내의 식물바이러스병 방제에 관한 연구로는 우유처리에 의한 TMV의 감염저지 효과(박 과 부, 1980), 계면 활성제 엽면 살포에 의한 TMV감염저지 효과(박 과 부, 1980) 등이 예비적으로 조사된 바 있다. 그러나 이들 중 우유 처리법은 실제 농가에서 TMV 방제 수단으로 사용되고 있으나 단순한 피막작용으로 인한 방제효과의 한계를 드러내고 있

Table 5. Control effects of culture filtrate from bacteria KTB61 against TMV infection through the trans -planting of tobacco seedlings (NC82) at field

Treatment	Control effect (%) after		
	2 weeks	3 weeks	4 weeks
Culture filtrate spray	59.6	42.7	43.0
" soaking	100	98.3	96.5
Diluted culture filtrate (×5) spray	57.9	49.7	48.2
Skim milk spray	8.8	6.3	6.7
" soaking	94.7	84.4	79.3
Control <sup>a</sup>	0	0	0

<sup>a</sup>Mueller Hinton broth

는 실정이다.

본 실험에서 사용된 KTB61 균주의 배양여액은 표면 전처리 시 100%, 이면 전처리 시 72.5%의 높은 TMV감염 억제 효과를 보였다. 한편, 표면 전처리 시 배양 여액을 처리하지 않은 대조 반엽의 병반 수도 현저하게 감소하여 활성물질이 잎 표면에서 이행하는 것으로 생각되었다. 따라서 KTB61 균주가 생산하는 항바이러스 물질의 감염억제활성이 skim milk나 sodium alginate에서 볼 수 있는 피막효과가 아님을 알 수 있었다. 또한 이면처리 시 잎 표면에서 TMV 감염 억제 활성을 보임으로써 활성물질의 식물 조직 침투이행 효과가 확인되었다. 항 식물 바이러스 물질 탐색에 있어서 감염 억제 효과를 갖는 물질은 다수 보고되어있다. 그러나 침투이행 효과를 갖는 항바이러스 물질은 많지 않으며, *M. jalapa*(Kubo 등, 1990), *Boerhaavia diffusa*(Verma 등, 1979; Verma 등, 1979)등이 생산하는 단백질이 보고되어있다.

또한 KTB61 균주가 생산하는 활성물질의 전신 이행 작용에 의한 감염 억제 효과(systemic effect)를 조사한 결과 78.4~87.5%의 높은 활성을 보였다. 이러한 전신효과가 활성물질의 식물조직 내에서의 이행효과인지 아니면 PR Protein (pathogenesis-related protein) 발현에 의한 식물의 전신저항성 획득의 결과인지 명확하지 않아 항 후 이에 대한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

전신 감염 기주인 NC82에서의 TMV 감염 예방 효과를 조사한 결과 KTB61 균주의 배양여액을 처리 후 동일면에 바이러스 접종 시 95%, 이면에 접종 시 75~80%의 병 발생 억제 효과를 보였다. 농가에서 TMV 방제제로 사용되고있는 skim milk (10% 수용액)는 TMV 접종면과 동일한 면에 처리할 경우 90%의 높은 병 발생 억제 효과를 보였으나 이면 접종 시에는 효과가 확인되지 않아 단순한 피막형성에 의한 TMV 감염 억제 작용임이 확인되었으며, KTB61의 배양여액은 이면 접종 시에도 병 발생 억제 효과를 보임으로서 활성 성분의 식물체 조직 내로의 침투작용에 의한 TMV 감염 억제 활성이 확인되었다. 특히 병징 발달이 억제되어 접종 2주 후 약한 TMV 병징을 보였던 식물체가 3주 후 병징 회복 현상을 보임으로서 KTB61 균주가

생산하는 TMV 감염 억제물질이 치료효과가 있음을 추측케 하였다.

## 결 론

식물 바이러스병 방제제 개발을 목표로 각 종의 미생물로부터 TMV 감염저해효과를 갖는 균주를 탐색하고 이들 중 침투이행 효과와 전신이행 효과를 갖는 균주를 선발하였다. 선발된 KTB61 균주는 Gram 음성 세균이었으며 형태는 간상형이었다. 생리적 특성과 세포지방산, isoprenoid quinone 성분 및 16S rDNA 분석 결과를 종합하여볼 때 *Pseudomonas* sp.로 분류 동정되었다.

KTB61 균주의 배양여액은 TMV와 혼합처리 또는 전처리 시 100%의 감염저해효과를 보였으며, 침투이행과 전신이행 효과(systemic effects)에 의한 TMV 감염저해효과도 확인되었다. 한편 전신감염기주인 NC82에서는 표면접종시 95%, 이면접종시 75~80%의 TMV 감염예방효과를 나타내었다.

포장에서의 방제효과는 담배 유묘 이식 24시간 전 배양여액 살포시 TMV 접종 4주 후 43.0%의 방제효과를 보였고, 담배 유묘를 침지처리 한 후 이식할 경우는 96.5%의 높은 방제효과를 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- Commoner, B., and F. L. Mercer (1952) The effect of thiouracil on the rate of tobacco mosaic virus biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 35: 278-288
- Dubio, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith (1956) Anal Chem., 28
- Gornoll, A. G., C. S. Bardawill and M. M. David (1949) J. Biol. Chem., 177, 751
- Harpaz, I (1982) Nonpesticidal control of vector-borne diseases. In: Pathogens, Vectors, and Plant Disease, pp.1-21. Academic Press.
- Hare, W. W. and G. B. Lucas (1959) Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk. Plant Dis. Repr. 43:

- 152-154
- Kubo, S., T. Ikeda, S. Imaizumi, Y. Takanami and Y. Mikami (1990) A Potent Plant Virus Inhibitor Found in *Mirabilis jalapa* L. Ann. Phytopath. Soc. Japan 56: 481~487
- Lawson, C., W. Kaniewski, L. Haley, R. Rozman, C. Newell, P. Sanders, and N. E. Tumer (1990) Engineering resistanc to mixed virus infection in a cimmercial potato cultivar : Resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. Bio/Technology 8: 127-134
- 박은경, 손준수, 이영근, 강여규, 오명희 (1988) 연초 병해충 발생기작 및 방제연구. 담배연구보고서 (경작분야, 환경편)
- 박은경, 부경생 (1980) 연초 virus병 종합방제에 관한 연구. 담배연구보고서(경작분야, 환경편) pp. 188-201
- Quiot, J. B., G. Labonne, and J. Marrou (1982) Controlling seed and insect-borne Viruses. In: Pathogens, Vectors, and Plant Diseases, pp. 96-122. Academic Press.
- Quemada, H. D., D. Gonsalves, and J. L. Slightom (1991) Expression of coat protein gene from cucumber mosaic virus strain C in tobacco : Protection against infection by CMV strains transmitted mechanically or by aphid. Phytopathology 81: 794-802
- Stevens, W. A. and T. Reynold (1992) Plant virus inhibitors from members of the Polygonaceae. Biomedical Letters 47: 269~273
- 서호찬, 최양문, 조홍연, 양한철(1997) *Lactobacillus jensennii* YW-33이 생산하는 다당류성 생물응집제 및 생산조건. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 3: 328-334
- Shin, Y. K., J.-S. Lee, C. O. Chun, H.-J. Kim, and Y.-H. Park (1996) Isoprenoid quinone profile of the *Leclercia adecarboxylata* KCTC 1036T. Journal of Microbiology and biotechnology 6: 68~69
- Thomas, J. and V. T. John (1980) Suppression of symptoms of rice tungro virus disease by carbendazim. Plant Dis. 64: 420-403
- Tomaru, K. and Y. Ohkawa (1975) The Inhibition Activity of Alginic Acid Against Tobacco Mosaic Virus Infection. Ann Phytopath. Soc. Japan 41: 155~161
- Takagi, Y (1978) Inhibitory Effect on Tobacco Mosaic Virus Infection Exerted by Aqueous Extract from the Culture of *Flammulina velutipes* Growth in the Saw Dust-Rice Bran Medium. Ann. Phytopath. Soc. Japan 44: 262~269
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. CLUSTAL W (1994) Improving the sesitivity of progressiv multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673~4680
- Watanabe, T. Y., K. Masuzawa, and T. Misato (1980) Inhibitory action of dodecylbenzene-sulfonate on tobacco mosaic vitus infection. J. Pesticide sci. 5: 503-509
- Yang, P., L. Vauterin, M. Vancaneyt, J. Swing, and K. Kersters (1993) Application of fatty acid methyl esters for taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol. 16: 47~71